

深海堆積物から分離した放線菌の生産する ケラチナーゼと難分解性ケラチンの分解

Production of keratinase by an actinomycete strain isolated
from deep-sea sediment and its decomposition capability on native keratins

今田千秋¹・武本裕樹¹・小林武志¹・寺原 猛¹・山田勝久²

Chiaki IMADA, Hiroki TAKEMOTO, Takeshi KOBAYASHI,

Takeshi TERAHARA and Katsuhisa YAMADA

Abstract

Cultivation conditions for keratinase production by an actinomycete strain isolated from deep-sea sediments of Kagoshima Bay at a depth of 218 m were investigated and characterized. Maximum production of the enzyme was obtained in a quarter strength artificial seawater. Purified enzyme obtained from the culture supernatant of the strain using cation exchange chromatography and gel filtration showed an approximate molecular weight of 30,000D with thermostable and pH stable characteristics. Various native keratins such as sea sponge, scales of red seabream, feather and sheep wool were completely decomposed by the partially purified enzyme, whereas shell of green turtle and barbell of minke whale were hardly decomposed.

Key Words: Deep-sea, Keratinase, Actinomycete, Native keratin, Sediment

要 旨

鹿児島湾水深 218 m の海底堆積物から分離された放線菌のケラチナーゼ生産の培養条件を検討し、さらに培養液から本酵素を単離・精製して諸性状を明らかにした。高い酵素活性は 1/4 強度 (25%, v/v) の人工海水濃度で見られた。培養液上清からイオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィーによりケラチナーゼを精製して分子量が約 3 万で、熱及び pH 安定性の高いことを確認した。また、本粗酵素はカイメン、マダイのウロコ、羽毛および羊毛などの難分解性ケラチンを原型を留めないほど分解したが、アオウミガメの甲羅およびミンククジラのヒゲなどの難分解性ケラチンはほとんど分解しなかった。

キーワード: 深海, ケラチナーゼ, 放線菌, 難分解性ケラチン, 堆積物

1. 緒 言

ケラチンは羽毛や毛髪, 羊毛などの主要なタンパク質で, 羽毛ではその 90%以上がケラチン様タンパク質で構成されていることが知られている

(Onifade *et al.*, 1998; Gousterova *et al.*, 2005).

近年, 様々な環境問題が深刻化している中, 家禽類を処理する過程でケラチンは大量の廃棄物となり, その処理方法は現状では焼却以外に無く, 問題視されている (Onifade *et al.*, 1998). 中でも羽毛は鳥

¹ 東京海洋大学 (〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

² 株式会社ディーエイチシー (〒106-8571 東京都港区南麻布 2-7-1)

の体重量の5~7%を占め、代表的な難分解性動物タンパク質の一つであり、世界的にも毎年20,000トン以上の羽毛が家禽業から廃棄物として排出されている(Williams *et al.*, 1990; Ionata *et al.*, 2008).

近年、羽毛を化学的な処理や、圧力や蒸気などを利用してフェザーミールとして家畜の飼料に加工する試みが広く行われている。しかしながら、これらの方法は現時点では高いコストがかかるのみならず、環境汚染を引き起こすなど様々な問題点が指摘されている(Baker *et al.*, 1981; Deydier *et al.*, 2005; Riffel *et al.*, 2003)。このようなことから、ケラチンを含む廃棄物を微生物の生産するケラチナーゼで分解する方法が俄かに注目されるようになってきた(Shigeri *et al.*, 2009)。この方法は効率的な生物変換であり、経済的かつ環境にも優しい(Gousterova *et al.*, 2005)。また、ケラチンの分解産物を家畜の飼料へ添加したり、ケラチナーゼをヒトの脱毛剤などへ応用することも可能である。

これまで報告されている微生物由来のケラチナーゼは、細菌(Riffel *et al.*, 2003; Manczinger *et al.*, 2003; El-Refai *et al.*, 2005)、真菌(Gradišar *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2005) および放線菌(Ignatova *et al.*, 1999; Gousterova *et al.*, 2005) から単離されており、様々な産業にも応用されている(Gupta and Ramnani, 2006)。しかしながら、これらはすべて陸上微生物である上、羽毛や羊毛などの難分解性ケラチンを完全に分解することはできない。また、海洋由来のケラチナーゼ生産微生物の報告も数少なく(Varbanets *et al.*, 2011)、特に放線菌については皆無の現状である。

このような背景から本研究では、深海環境中の放線菌に着目し、鹿児島湾の深海底堆積物中よりケラチナーゼを生産する放線菌を分離し、ケラチナーゼの生産条件を検討し、あわせて本酵素を培養液中から単離・精製し、その諸性状を明らかにすることを目的とした。また、それと並行して本粗酵素を用いて難分解性動物タンパク質である羽毛、羊毛および人毛などの分解実験を行い、産業利用を視野に入れた予備的研究を行った。

2. 材料および方法

2.1 ケラチナーゼ生産放線菌の分離と諸性状

ケラチナーゼ生産菌の分離には、鹿児島湾の水深218 mの海底から、ピストンコア採泥器で採集した海底堆積物を用いた。この堆積物0.5 gに生理食塩水0.5 mlを加え、よく攪拌した後、55°Cで30分間加熱して夾雑する海洋細菌を殺滅したのち、球菌の発育を阻害する抗生物質のノボビオンを最終濃度1 µg/mlになるように添加したケラチン寒天培地(Tendler and Burkholder, 1961)に100 µl塗抹した。この培地を50°Cで2日間培養して生じたコロニーの周囲にケラチン分解に伴う透明ハローを形成した株をケラチナーゼ生産菌(KAG02-27株と命名)として分離した。

2.2 人工海水中での分離放線菌の増殖及びケラチナーゼ活性

人工海水(Hidaka and Sakai, 1968)の濃度を0, 1/4 (25%, v/v), 1/2 (50%, v/v), 3/4 (75%, v/v), および1/1強度(100%, v/v)に調整したケラチン液体培地(Table 1)を作成し、100 ml容バツフル付き三角フラスコに培地20 mlを分注し、オートクレーブ滅菌後、供試菌株を植菌し、50°Cで72時間振盪培養(160 rpm)した。培養後、培養液を濾過(アドバンテック No.1 濾紙)して菌体を集め、60°Cにおいて48時間乾燥させた後、乾燥重量を測定し、ケラチン分解の指標とした。また、濾液についてはさらに遠心分離(4°C, 20,000×g, 10分間)し、得られた培養上清のケラチナーゼ活性を測定した。

2.3 ケラチナーゼ活性測定

ケラチナーゼの活性測定はIgnatova *et al.* (1999)の方法を一部改変して行った。すなわち2.2で述べた培養上清200 µlを50°Cで5分間プレインキュベーションし、2%ケラチン溶液(50 mMリン酸緩衝液, pH 7.3)400 µlを加え、50°Cで3時間インキュベーションした。インキュベーション後、1%トリクロロ酢酸(TCA)800 µlを加え

酵素反応を停止させ、遠心分離して上清の吸光度 (OD_{280}) を測定した。また、プレインキュベーション後、TCA とケラチン溶液の添加順序を逆にしたものを同様に操作してブランクとし、酵素反応を行ったものとの吸光度の差で酵素活性を評価した。

2.4 ケラチナーゼの単離・精製

KAG 02-27 株を Table 1 に示すケラチン液体培地で大量培養し、ケラチナーゼの単離・精製に供した。大量培養ではケラチン液体培地 2,000 ml に本株を植菌した後、50°C で 96 時間回転振盪培養 (160 rpm) した。培養後、培養液を遠心分離 (4°C, 20,000×g, 20 分間) し、その上清 1,710 ml をケラチナーゼの精製に供した。得られた培養上清に、飽和濃度の 90% まで硫酸アンモニウムを加えて攪拌溶解後、4°C で一昼夜放置した。その後、遠心分離し、得られた沈澱物を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。これをさらに、透析膜 (透析用セルロースチューブ、分画分子量 12,000-14,000, 三光純薬) に入れた後、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で一昼夜透析し (4°C), その内液を回収した。この透析内液をあらかじめ 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィーカラム (Cellufine C-500 m, 生化学工業, $\phi 2.6 \times 52.5$ cm) に充填し、1,200 ml の同緩衝液で流出した後、同緩衝液に 1 M NaCl を添加したもので直線的濃度勾配 (1,200 ml-3,800 ml) によって試料を溶出させた。なお、流速は 1.0 ml/min に調節し、10 ml ずつフラクションを分取した。溶出後、各フラクションの 280 nm 吸光度とケラチナーゼ活性を測定した。得られた活性フラクションを合一し、限外濾過 (NMWL5,000,

Millipore) により濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl High Resolution S-200 HR, GE Healthcare Bio-Science, $\phi 1.6 \times 97.5$ cm) に供した。移動相は、50 mM NaCl-10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を用い、流速 0.5 ml/min で溶出させ 10 ml ずつフラクションを分取した。得られたフラクションについて陽イオン交換クロマトグラフィーと同様、280 nm の吸光度及びケラチナーゼ活性を測定した。

2.5 タンパク質濃度の測定

各精製段階で得られたサンプルのタンパク質濃度は、DC Protein Assay (Bio-Rad) を用いて、ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) をスタンダードとしてタンパク質を定量し、精製試料のタンパク質濃度 (mg/ml), 総活性 (AU), 比活性 (AU/mg protein) 並びに回収率 (%) を得た。

2.6 精製酵素の SDS-PAGE 解析

精製酵素は TCA 沈澱法により濃縮し、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を行った。すなわち精製フラクション 900 μ l に 20% TCA 100 μ l を加え攪拌後、5 分間遠心分離 (4°C, 20,000×g) した。この上清を除去後、沈殿にジメチルエーテル 800 μ l を加え攪拌し、再度遠心分離した。この沈殿を室温乾燥後、SDS-PAGE sample buffer (4% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 6.8) 10 μ l を添加し、95°C にて 3 分間加熱変性処理を行った後、電気泳動に供した。なお、電気泳動には、ラプラス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO) を用い、分子量マーカーとして Polypeptide SDS-PAGE Standard (Bio-Rad) を使用し、室温で 20 V, 75 分間電気泳動を行った。なお、SDS-PAGE は岡田・宮崎 (1996) のプロトコールに従った。

2.7 精製ケラチナーゼの熱安定性、至適温度、pH 安定性の試験

本酵素の熱安定性は精製ケラチナーゼを 20-100

Table 1 Composition of keratin liquid medium

Keratin(TCI)	10g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1g
KCl	1g
Bacto-yeast extract (Difco)	0.4g
Distilled water	750ml
Artificial seawater	250ml
pH	8.0

℃で60分間加熱した後、残存活性を測定して評価した。また、至適温度は30–90℃の範囲で活性測定を行って求めた。ケラチナーゼの熱安定性および至適温度は最高温度での活性を100%とした相対活性で評価した。pH安定性は、精製ケラチナーゼのpHを3.0–11.0に調整し30分間放置後、pH 7.0に再調整し、残存活性を測定し、pH 7.0における活性を100%とした相対活性で評価した。

2.8 各種無機塩添加による精製ケラチナーゼの安定性試験

精製ケラチナーゼに終濃度1 mMになるように、NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, MnCl₂·4H₂O, FeSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, ZnSO₄·7H₂O, NiCl₂·6H₂O および SrCl₂·6H₂O をそれぞれ加えて活性測定後、最大活性を100%とした相対活性で無機塩に対する精製ケラチナーゼの安定性を評価した。

2.9 難分解性動物性タンパク質の分解実験

Table 1 に示す培地成分のケラチンの代わりに、難分解性動物性タンパク質であるザラカイメン、マダイの乾燥ウロコ、アオウミガメの甲羅、ミンククジラのヒゲ（乾燥）、鶏の羽毛、羊毛、カニクイザルの体毛、人の体毛および毛髪を添加し、KAG02-27 株を植菌した後、50℃で3日間回転振盪培養（160 rpm）し、遠心分離（4℃, 20,000×g, 10分間）で菌体を除いた培養液上清について、2.3 に示す方法でケラチナーゼ活性を測定した。また、ケラチンの分解率については目視により完全に分解しているものを++++, ほぼ完全に分解しているものを+++ , 分解が確認できるものを++ , 分解していないが強度が低下しているものを+ , 分解が見られないものを–の5段階で判定した。

3. 結果及び考察

本株は16S rRNA 遺伝子による系統解析から、*Laceyella sacchari* NBRC 13920 および *L. sacchari* NBRC 15852 株と99%以上の相同性を示した（デー

タ未発表）。*Laceyella* 属は Yoon *et al.* (2005) によって *Thermoactinomyces* 属から再分類されたため、まだ不明な点の多い放線菌であるが、主に温泉など高温域に生息することが報告されている (Nilsson *et al.*, 2006)。しかし、近年の *Laceyella* 属に関する研究では、ケラチン分解能を有するものは報告がない。

Figure 1 に示したように、本株は人工海水濃度25–50% (v/v) に調整した培地でケラチナーゼ活性が高く、25–50% (v/v) では25% (v/v) の乾燥重量が最も低かったことから、25% (v/v) で最も効率よくケラチンを分解していると推察された。海水濃度100% (v/v) で分解率が低下した理由として、海水濃度が高いと試薬のケラチンが凝固し、本株が効率的にケラチンを分解することができなかったことが原因と考えられる。

本株が産生するケラチナーゼをイオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。その結果、Table 2 に示すようにケラチナーゼは培養上清中から約29%の収率（ゲル濾過クロマトグラフィー後の全活性/培養液上清の全活性×100）で、約2,000倍の純度（ゲル濾過クロマトグラフィー後の比活性/培養液上清の比活性）まで精製された。得られた精製標品について、SDS-PAGEを行ったところ、Fig. 2 に示すように約30 kDa 付近にメジャーバンドが見られた。この結果は Eun-Ja *et al.* (2010) の報告した51 kDa, Anbu *et al.* (2005) の39 kDa, Jeon and Park (2002) の65 kDa, および Bernal *et al.* (2006)

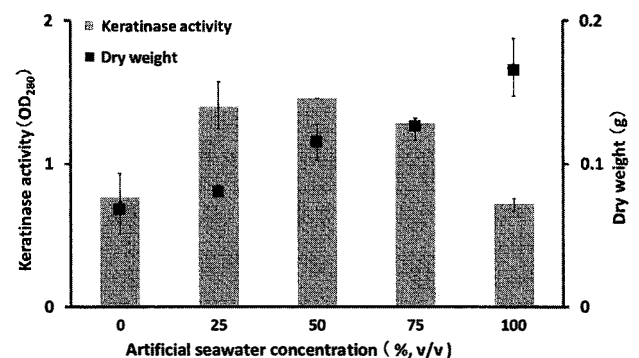


Fig. 1. Effects of an artificial seawater concentration on the production of keratinase and dry weight by strain KAG 02-27.

Table 2 Purification of keratinase from the strain KAG 02-27

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (TA)	Specific activity (TA/mg protein)	Recovery(%)
Cell culture supernatant	11,799	536,940	45.5	100
Ammonium sulfate precipitation(90%)	842	279,180	331.6	52.0
Dialysis (Dialyzate) against 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.0	741	251,790	339.8	46.9
Cellufine C-500m ion exchange chromatography ($\Phi 2.6 \times 52.5$, Linear conc. gradient of NaCl, 0-1M)	113	214,830	1,901.1	40.0
Sephacryl high resolution S-200 HR chromatography ($\phi 1.6 \times 97.5$, 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)	1.68	158,704	94,466	29.6

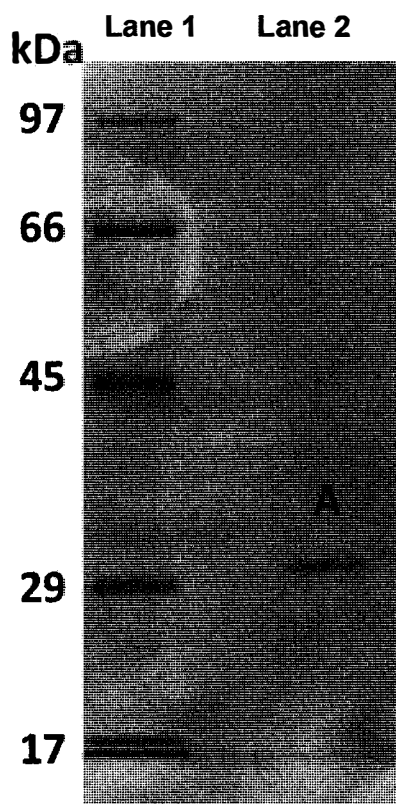


Fig. 2. Tricine-SDS-PAGE of the purified keratinase. Sample: lane 1, protein standards; lane 2, A; Keratinase.

の 120 kDa のいずれとも一致しないことから、本ケラチナーゼは新規酵素の可能性が示唆された。

本酵素の熱安定性および至適温度の測定結果をそれぞれ Fig. 3 に示した。この図から明らかなよう

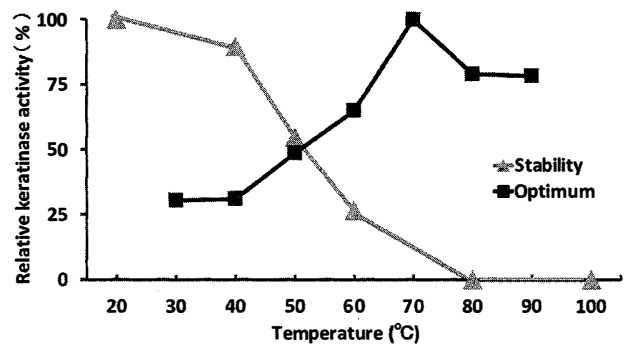


Fig. 3. Thermostability and optimum temperature of keratinase from the strain KAG 02-27.

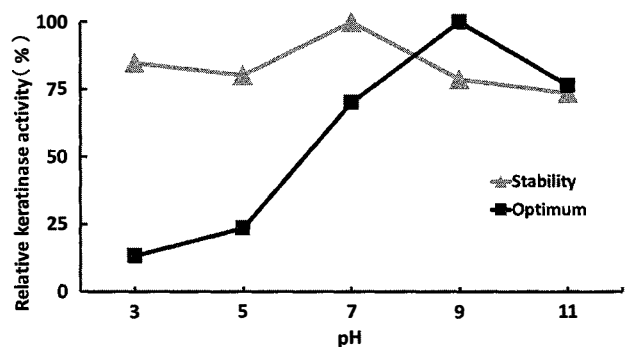


Fig. 4. pH-stability and optimum pH of keratinase from the strain KAG 02-27.

に、本酵素の至適温度は 70°C であったが、熱安定性はあまり高くなく、40°C を超えると急激に活性が低下した。また、Fig. 4 の結果から明らかなように、本酵素は pH 3-11 までほぼ安定であり、至適

Table 3 Effects of inorganic salts on the keratinase activity produced by the strain KAG 02-27

Inorganic salt	Relative activity (%)
None	100
NaCl	106
KCl	104
LiCl	104
CaCl ₂ ·2H ₂ O	103
MgSO ₄ ·7H ₂ O	101
MnCl ₂ ·4H ₂ O	113
FeSO ₄ ·7H ₂ O	134
CuSO ₄ ·7H ₂ O	36
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	105
NiCl ₂ ·6H ₂ O	100
SrCl ₂ ·6H ₂ O	100

反応pH は9であった。

Table 3 に種々の無機塩存在下における本酵素の活性測定結果を示した。本酵素は銅イオン存在下において活性の低下が見られたが、その他の無機塩を添加してもあまり活性の低下や上昇は見られなかった。

Figure 5 に本株を用いた難分解性ケラチンの分解とケラチナーゼ活性測定結果を示した。この図からわかるように、難分解性ケラチンのザラカイメン、マダイのウロコ、鶏の羽毛および羊毛については原型を留めないほど強い分解が見られた。一方、アオウミガメの甲羅およびミンククジラのヒゲの難分解性ケラチンでは顕著な分解は見られなかった。しかし、これらのサンプルのケラチナーゼ活性が高かったため、本株がこれらの難分解性ケラチン以外の物質を利用していることがわかった。また、カニクイザルの体毛および人の体毛は、溶解するというよりもむしろ細かく切断されるように分解されていた。このことはサルおよびヒトの体毛を構成するケラチン繊維の微細構造に起因しているのかもしれない(松崎ら, 2003)。

本株による鶏の羽毛分解の様子を Fig. 6 に示した。この写真からわかるように羽毛は軸まで完全に分解されることが判明した。また、ヒトの体毛を電

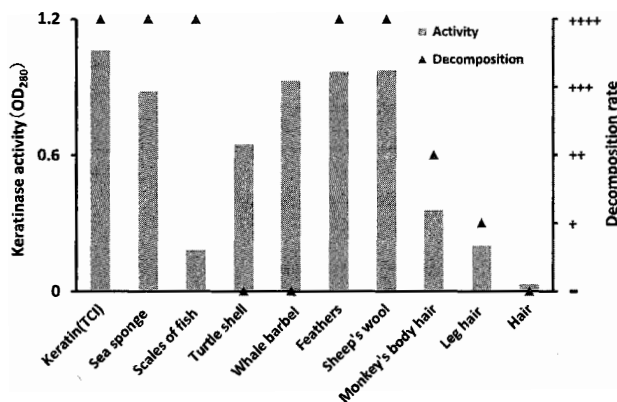


Fig. 5. Keratinase activity and decomposition rate of native keratin by strain KAG 02-27.

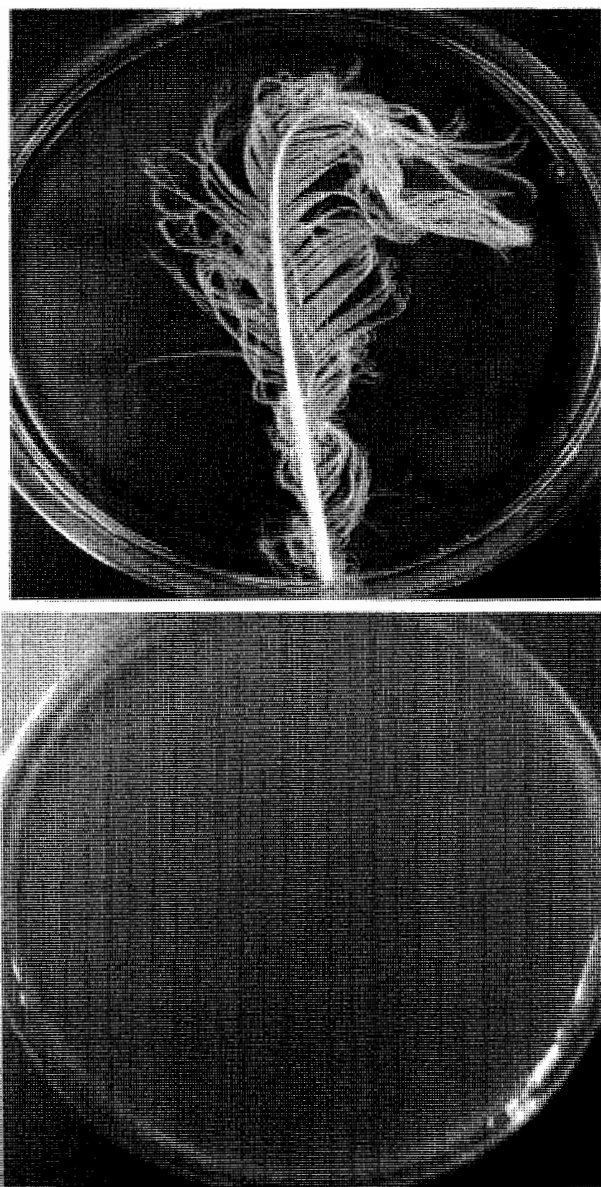


Fig. 6. Chicken feather after incubation for 3 days at 50°C, 160 rpm (after 121°C, 15 min). Upper, without the strain KAG 02-27; Under, with the strain KAG 02-27

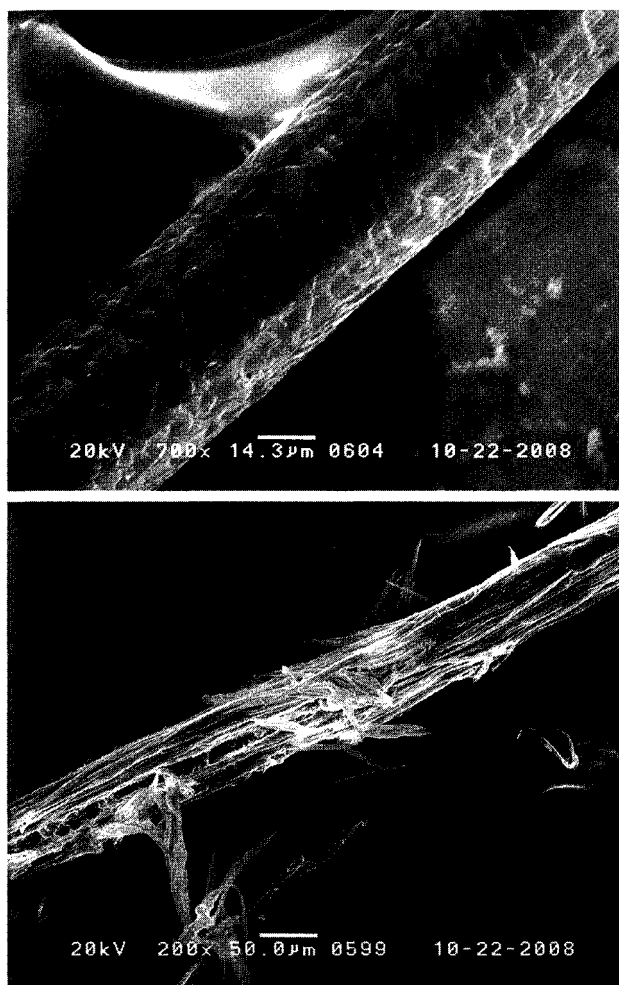


Fig. 7. Scanning electron micrograph of human leg hair after incubation for 3 days at 50°C, 160 rpm (after 121°C, 15 min)
Upper, without the strain KAG 02-27;
Under, with the strain KAG 02-27

子顕微鏡で観察したところ、体毛の周囲のキューティクル層が剥離し、非常にもろい状態になっていることがわかった (Fig. 7)。しかしながら、ヒトの毛髪ではケラチナーゼ活性もケラチンの分解も見られなかった (Fig. 5)。この理由としては、毛髪は体毛とは構造が類似しているものの太さが異なるために、ケラチナーゼによる分解に差が生じたものと考えられた。

本研究では海洋環境から分離されたケラチナーゼ生産放線菌の諸性状について報告したが、このように強いケラチン分解活性を有する陸上微生物については全く報告されておらず、海洋環境からこのような珍しい放線菌が単離されたことは大変興味深く、今後本株が生産するケラチナーゼの基質特異性に対

する研究を深め、産業利用を視野に入れた難分解性ケラチンの分解が期待される。

謝 辞

本研究はジオバイオテクノロジー振興会議の資金援助を得て行った。

参考文献

- Anbu, P., S. C. B. Gopinath, A. Hilda, T. P. Lakshmi and G. Annadurai (2005) Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 639-647.
- Baker, D. H., R. C. Blitenthal, R. C. Boebel, G. L. Czamecki, G. K. Southern and G. M. Willis (1981) Protein-amino acid evaluation of steam-processed feather meal. *Poult. Sci.*, 60, 1865-1872.
- Bernal, C., J. Cairo and N. Coello (2006) Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 49-54.
- Deydier, E., R. Guilet, S. Sarda and P. Sharrock (2005) Physical and chemical characterization of crude meat and bone meal combustion residue: "waste or raw material?". *J. Hazard Mater.*, 121, 141-148.
- Eun-Ja, J., M.-S. Rhee, G.-P. Kim, K.-H. Lim, D.-H. Yi and B. H. Bang (2010) Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading bacterium, *Bacillus* sp. SH-517. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 53, 43-49.
- El-Refai, H. A., M. A. AbdelyNaby, A. Gabella, M. H. El-Araby and A. F. A. Fattah (2005) Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochem.*, 40, 2325-2332.
- Friedrich, J., H. Gradisar, M. Vrecl and A. Pogacnik (2005) In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 455-460.
- Gousterova, A., D. Braikova, I. Goshev, P. Christov, K. Tishinov, E. Vasileva-Tonkova, T. Haertle and P. Nedkov (2005) Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis *Lett. Appl. Microbiol.*, 40, 335-340.
- Gradišar, H., S. Ken and J. Friedrich (2000) Keratinase

- of *Doratomyces microsporus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 196-200.
- Gupta, R. and P. Ramnani (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl. Microbiol. Biotechnol, 70, 21-33.
- Hidaka, T. and Y. Sakai (1968) Comparative observation of the inorganic salt requirements of the marine and terrestrial bacteria. Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ., 12, 125-149.
- Ignatova, Z., A. Gousterova, G. Spassov and P. Nedkov (1999) Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Can. J. Microbiol, 45, 217-222.
- Ionata, E., F. Canganella, G. Bianconi, Y. Benno, M. Sakamoto, A. Capasso, M. Rossi and F. La Cara (2008) A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. *pennavorans* bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. Microbiol. Res., 163, 105-112.
- Jeon, T. W. and K. M. Park (2002) Purification and characterization of a keratinase from *Bacillus licheniformis* strain for degradation of egg shell membrane. Kor. J. Food Sci. Anim. Resour., 22, 259-266.
- Manczinger, L., M. Rozs, C. Vagvolgyi and F. Kevei (2003) Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. World J. Microbiol. Biotechnol., 19, 35-39.
- Nilsson, C., F. Nilsson, P. Turner, M. Sixtensson, N. E. Karlsson, O. Holst, A. Cohen and L. Gorton (2006) Characterization of two novel cyclodextrinases using on-line microdialysis sampling with high-performance anion exchange chromatography. Anal. Bioanal. Chem., 385, 1421-1429.
- Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallan and S. All-Zarban (1998) Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresource Technol., 66, 1-11.
- Riffel, A., F. Lucas, P. Heeb and A. Brandelli (2003) Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Arch. Microbiol., 179, 258-265.
- Shigeri, Y., T. Matsui and K. Watanabe (2009) Decomposition of intact chicken feathers by a thermophile in combination with an acidulocomposting garbage-treatment process. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 2519-2521.
- Tendler, M. D. and P. R. Burkholder (1961) Studies on the thermophilic actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol., 9, 394-399.
- Varbanets, L. D., L. V. Avdeeva, N. V. Borzova, E. V. Matseliukh, A. V. Gudzenko, E. A. Kiprianova and L. V. Iaroshenko (2011) The black sea bacteria-producers of hydrolytic enzymes. Microbiol., 73, 9-15.
- Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Jr. MacKenzie and J. C. H. Shih (1990) Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 56, 1509-1515.
- Yoon, J.-H., I.-C. Kim, Y.-K. Shin, and Y.-H. Park (2005) Proposal of the genus *Thermoactinomyces sensu stricto* and three new genera, *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium* and *Seinonellla*, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 395-400.
- 岡田雅人・宮崎香 (1996) タンパク質実験ノート下分離同定から機能解析へ. 羊土社, 東京, pp.17-37.
- 松崎貴・新井幸三・上甲恭平・細川稔・中村浩一 (2003) 羊毛および毛髪ケラチンの構造と物理化学的性質. 最新の毛髪科学. フレグランスジャーナル社, 東京, pp.6-61.
- (2012年2月15日受付; 2012年6月7日受理)